

学位論文の要約

# Isoflurane Impairs Learning and Hippocampal Long-term Potentiation via the Saturation of Synaptic Plasticity

(イソフルランは神経可塑性の飽和を介して海馬長期増強と海馬依存性記憶学習を抑制する)

Kazuhiro Uchimoto

内本 一宏

Anesthesiology and Critical Care Medicine  
Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学大学院医学研究科 生体制御・麻酔科学

( Doctoral Supervisor : Takahisa Goto, Professor )

( 指導教員 : 後藤 隆久 教授 )

# Isoflurane Impairs Learning and Hippocampal Long-term Potentiation via the Saturation of Synaptic Plasticity

(イソフルランは神経可塑性の飽和を介して、海馬長期増強と海馬依存性記憶学習を抑制する)

<http://journals.lww.com/anesthesiology/pages/articleviewer.aspx?year=9000&issue=00000&article=98097&type=abstract>

## 【背景】

全身麻酔による脳神経毒性によっては、持続性認識および学習障害を誘発することが知られているが、そのメカニズムや現象の全体像はいまだ十分に解明されていない。吸入麻酔薬に曝露させると、幼若動物では中枢神経系のアポトーシス誘発やシナプスの発達阻害を介して長期の記憶学習障害を生じることが知られており、老齢動物では $\beta$ -アミロイドの蓄積などを介して長期の認知記憶障害を生じることが知られているが、成体動物では十分な解明を進んでいない。

げっ歯類において、抑制性回避 (Inhibitory Avoidance; IA) という行動課題における空間認知を含む文脈依存的な記憶学習が、海馬 CA3 領域からの Schaffer 側枝が CA1 領域で形成するシナプスにおける長期増強 (Long term potentiation; LTP) に依存し、またその分子的基盤として、GluA1 サブユニットのリン酸化を介した (GluA1 を含む)  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA 受容体) のシナプス膜表面への輸送現象が知られている。さらに GluA1 サブユニットについては、細胞内に再取り込みされたあと、ユビキチン化による標識をうけてプロテアソームによって分解されることが知られている。

今回の研究で我々は、吸入麻酔薬曝露によって成体ラットでも認知記憶障害が生じるという仮説を立案し、IA test を用いて吸入麻酔薬曝露後の認知記憶能の変化を行動学的に検証し、また多

点血電極刺激測定装置 (MED64 system) を用いて海馬の急性スライスのシナプス可塑性の変化を電気生理学的に検証し、海馬検体のホモジェネートから抽出したシナプトソーム (synaptoneurosome) 分画のウェスタンブロット法 (Western Blotting; WB) を行って GluA1 の発現量の変化を検証した。さらに海馬検体のホモジェネートから免疫沈降法を用いて抽出した GluA1 について、ユビキチン結合レベルの変化を検証した。

## 【方法】

**麻酔** 成体 (体重 250–320g) の雄性 Wistar-Imamichi ラットを 1.8% のイソフルランに 2 時間曝露させた吸入麻酔薬曝露モデルを作成した。げっ歯類の最小肺胞濃度 (MAC) を考慮すると、1.3MAC に相当する。対照として、酸素投与のみのコントロール群と、0.4MAC 相当の 0.6% イソフルラン群と、0.8MAC 相当の 1.2% イソフルラン群を作成した。全ての群で、ラットは自発呼吸下で、酸素濃度は 33% に保たれ、麻酔チャンバー内の二酸化炭素濃度は 3mmHg 以下に維持された。体温は直腸温で  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  に維持された、コントロール群のみは、他のイソフルラン群でラットが入眠するまでに与えられるのと同様のストレスにさらす為に、2 時間ではなくて 5 分間だけ、麻酔チャンバーに入れられた後、直ちに飼育ケージに戻された。

**血行動態評価** 血行力学と動脈血ガス (ABG) の評価のために、イソフルラン麻酔下で、大腿動脈カニューレーションを行ったのちに、1.8% イソフルランによる麻酔を改めて行い、Power Lab システムを用いた血行動態の測定および 60 分後と 120 分後の ABG の測定を行った。

**行動学的評価** 吸入麻酔曝露の 1, 3, 7 または 28 日後のいずれかで、IA test を行った。明室と暗室が連結した実験装置の明室にラットを入れて、ラットが通常好む暗室にラットが入ると底面に弱い電気刺激が流れることを学習させるもので、1 回目のコンディショニングの 30 分後に 2 回目のリテンション (想起) テストを行った。明室と暗室の間のゲートが開いてから、ラットが暗室に入るまでの時間 (latency) を測定し比較した。

**電気生理学的測定** 吸入麻酔曝露の 7 日後に、海馬を含む矢状断面の急性スライスを作成し、多点血電極装置 (MED64 system) を用いて、Shaffer collateral/CA1 シナプスの細胞外集合電位 (extracellular field excitatory postsynaptic potentials; fEPSPs) を測定した。スライス毎に 100Hz, 10Hz, 1Hz のいずれかの誘発刺激を加えて長期増強 (Long-term potentiation; LTP) または長期抑圧 (Long-term depression; LTD) を誘発し、fEPSP 波形の amplitude と slope を測定し比

較した。

**生化学的検討** 吸入麻酔曝露の 1, 7 または 28 日後に海馬検体を採取し、ホモジェネートを作成した。さらにフィルター法を用いて synaptoneurosome 分画を抽出した。全分画と synaptoneurosome 分画のそれぞれに対して、WB を行って GluA1 の発現量を半定量して比較した。また、吸入麻酔曝露の 7 日後の海馬検体について qRT-PCR 法を用いて、mRNA の定量を行い比較した。さらに、吸入麻酔曝露の 7 日後の海馬検体のホモジェネートから免疫沈降法を用いて GluA1 を抽出し、WB を行って、ユビキチン結合レベルを半定量し比較した。

## 【結果と考察】

**血行動態評価** 2 時間の 1.8% イソフルラン麻酔中の血圧、脈拍数と、ABG で測定した pH, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub> の変化は通常の生理的範囲であった。

**行動学的評価** 2 時間の 1.8% イソフルラン曝露は、その 7 日後に空間認知・文脈的記憶学習の障害を生じ、それは可逆的であった。また、7 日後の記憶学習障害は、1.8% イソフルラン群で顕著であり、濃度依存性を示した。(Figure 1)

2 時間の 1.8% イソフルラン曝露の 1, 3, 7, 28 日目のいずれかに、IA test (コンディショニングおよびリテンション) を行ったところ、latency は 7 日目に有意に減少した (コントロール (n = 39), 294 ± 34s ; 1 日目 (n = 16), 379 ± 37s ; 3 日目 (n = 16), 164 ± 41s ; 7 日目 (n = 28), 138 ± 28s ; 28 日目 (n = 24), 290 ± 36s ; F (4, 118) = 6.658, P < 0.001 ; コントロール対 7 日後, P = 0.002)。

さらに 2 時間の 0.6%, 1.2%, 1.8% のいずれかの濃度のイソフルランに曝露させた 7 日後に、IA test (コンディショニングおよびリテンション) を行ったところ、latency は 1.8% 群で有意に減少した (コントロール (n = 39), 294 ± 34s ; 0.6% イソフルラン (n = 24), 181 ± 37s ; 1.2% イソフルラン (n = 21), 213 ± 39s ; 1.8% イソフルラン (n = 28), 138 ± 28s ; F (3, 108) = 4.261, P = 0.007 ; コントロール対 1.8% イソフルラン, P = 0.003)。

**電気生理学的測定** 2 時間の 1.8% イソフルラン曝露の 7 日後の海馬急性スライスでは、長期増強 (LTP) の抑制と、長期抑圧 (LTD) の増強が生じていた。

高頻度刺激 (100Hz; HFS) に誘発される LTP は抑制された (コントロール (n = 6), 125.7 ± 2.5% ; イソフルラン (n = 6), 105.70 ± 1.35% ; P < 0.001)。

さらに低頻度刺激 (1Hz; LFS) に誘発される LTD は増強された (コントロール (n = 6),  $98.60 \pm 1.7\%$ ; イソフルラン (n = 6),  $78.3 \pm 4.8\%$ ;  $P = 0.003$ ).

**生化学的検討** 2 時間の 1.8%イソフルラン曝露の 7 日後に, synaptoneurosome 分画の GluA1 が一時的に増加し, そのユビキチン結合レベルが減少していた.

1 日目, 7 日目, 28 日目の synaptoneurosome 分画の GluA1 を測定したところ (イソフルラン,  $F(1, 27) = 6.933$ ,  $P = 0.014$ ; 経過日数,  $F(2, 27) = 0.783$ ,  $P = 0.783$ ; イソフルラン  $\times$  経過日数,  $F(2, 27) = 0.783$ ,  $P = 0.783$ ), 7 日目に一時的な増加を認めた (コントロール (n = 8),  $100 \pm 9.7\%$ ; イソフルラン (n = 7),  $138.9 \pm 8.9\%$ ;  $P = 0.012$ ), しかし, 1 日目 (コントロール (n = 6),  $100 \pm 11.3\%$ ; イソフルラン (n = 5),  $127.2 \pm 8.3\%$ ;  $P = 0.087$ ) および 28 日目 (コントロール (n = 6),  $100 \pm 28.1\%$ ; イソフルラン (n = 5),  $121.5 \pm 15.2\%$ ;  $P = 0.498$ ) ではイソフルラン群で統計学的に有意ではなかった.

そして全分画では, 1 日目 (コントロール (n = 6),  $100 \pm 23.0\%$ ; イソフルラン (n = 5),  $88.2 \pm 7.3\%$ ), 7 日目 (コントロール (n = 8),  $100 \pm 3.6\%$ ; イソフルラン (n = 7),  $136 \pm 1.4\%$ ) および 28 日目 (コントロール (n = 6),  $100 \pm 17.7\%$ ; イソフルラン (n = 5),  $100.3 \pm 15.5\%$ ) であり, イソフルラン群で特に 7 日目に増加傾向を認めるものの統計学的に有意な変化を認めなかった (イソフルラン,  $F(1, 30) = 0.620$ ,  $P = 0.437$ ; 経過日数,  $F(2, 30) = 2.279$ ,  $P = 0.120$ ; イソフルラン  $\times$  経過日数,  $F(2, 30) = 2.279$ ,  $P = 0.120$ )

次に 7 日目の GluA1 の mRNA 量も測定したが変化していなかった (コントロール (n = 4),  $100 \pm 13.5\%$ ; イソフルラン (n = 5),  $99.6 \pm 17.9\%$ ;  $P = 0.97$ ).

さらに 7 日目の GluA1 のユビキチン結合レベルを測定したところ有意に減少していた (コントロール (n = 7),  $100 \pm 8.7\%$ ; イソフルラン (n = 7),  $71.1 \pm 6.1\%$ ;  $P = 0.014$ ).

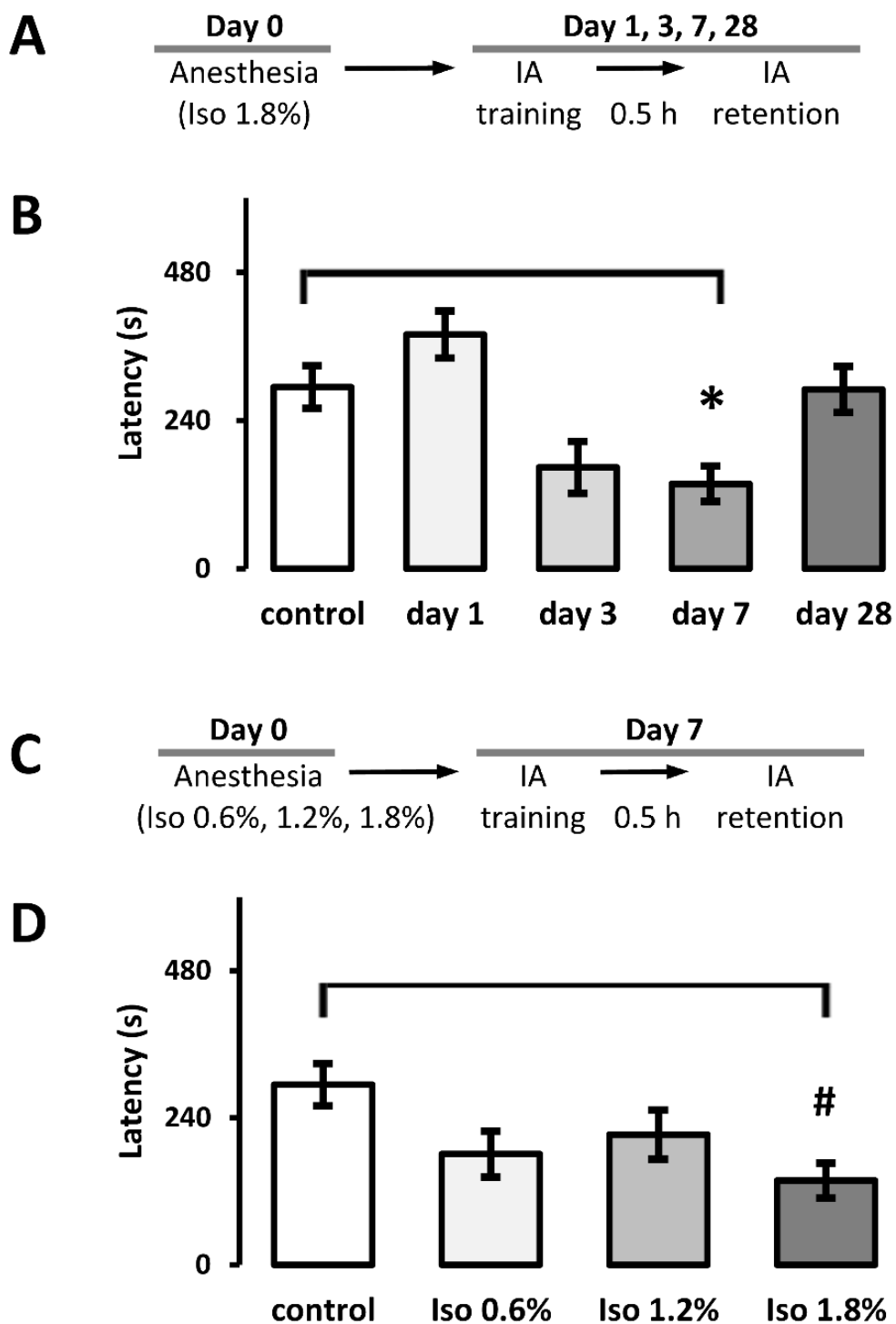
2 時間の 1.8%イソフルランによる全身麻酔は, 遠隔期 (7 日後) に可逆的な海馬依存性記憶学習の障害を生じる. 7 日目には海馬記憶学習の障害と一致して, 海馬 SC/CA1 における LTP の抑制と LTD の増強が生じていた. そこで背側海馬シナプスにおける GluA1 含有 AMPARs の膜への挿入 (trafficking) が低下している可能性が示唆されたが, 予想に反して synaptoneurosome 分画の GluA1 は増加していた. GluA1 発現量の変化は海馬記憶学習の変化と経時的に一致しており, 相関関係が強く示唆された. 我々は, シナプスにおける GluA1 の過剰発現が更なる GluA1

の trafficking を阻害している可能性があると考えている。そのようなシナプスの飽和現象はこれまでも報告がある。過剰な GluA1 は、シナプスにおける GluA1 含有 AMPA 受容体の再取り込みを促進している可能性があり、LTD の強化にも関与している可能性がある。さらに、GluA1 の過剰発現のメカニズムとして、ユビキチン結合レベルの低下によって再取り込み後の GluA1 の代謝分解が抑制されている可能性が示唆された。

海馬 LTP には AMPA 受容体のほかに NMDA 受容体の関与も知られているが、今回の研究ではイソフルランによる海馬神経可塑性の変化に対する NMDA 受容体の関与については検証されていない。また、イソフルランが GluA1 のユビキチン結合を低下させている機序も未解明であり、今後の検証を必要とする。

本研究では、成体ラットに対する 2 時間の臨床用量のイソフルラン曝露によって、その遠隔期（麻酔薬曝露の数日後以降）に、空間認知を含む文脈依存的な記憶学習が障害され、海馬長期増強が抑制されることが示された。シナプスにおける GluA1 が過剰発現しており、シナプスの飽和現象が生じて GluA1 の trafficking が抑制されている可能性が示唆された。

さらに海馬 GluA1 の再取り込み後のユビキチン結合が何らかの機序で阻害されていることが、GluA1 の過剰発現の原因の一つである可能性が示唆された。



**Figure 1.** 行動学実験.

(A,B) 2 時間の 1.8%イソフルラン曝露は、その 7 日後に空間認知・文脈的記憶学習の障害を生じた ( $*P=0.002$ , *post hoc Dunnett's test*) (C,D) 7 日後の記憶学習障害は、1.8%イソフルラン群で顕著であり、濃度依存性を示した ( $*P=0.003$ , *post hoc Dunnett's test*),

(Uchimoto K et al. Anesthesiology 2014; Figure 1)

# 論文目録

## I 原著論文

Isoflurane Impairs Learning and Hippocampal Long-term Potentiation via the Saturation of Synaptic Plasticity.

Uchimoto K, Miyazaki T, Kamiya Y, Mihara T, Koyama Y, Taguri M, Inagawa G, Takahashi T, Goto T: *Anesthesiology* 2014:1–9, April 2014. (Epub ahead)  
doi:10.1097/ALN.0000000000000269

## II 副論文

## III 参考論文

1. Bumetanide, an inhibitor of cation-chloride cotransporter isoform 1, inhibits  $\gamma$ -aminobutyric acidergic excitatory actions and enhances sedative actions of midazolam in neonatal rats

Koyama Y, Andoh T, Kamiya Y, Morita S, Miyazaki T, Uchimoto K, Mihara T, Goto T: *Anesthesiology* Vol. 119, No. 5, 1096–108, November 2013.  
doi: 10.1097/ALN.0b013e31829e4b05

2. Effects of volatile anesthetics on the circadian rhythms of rat hippocampal acetylcholine release and locomotor activity

Kikuchi T, Tan H, Mihara T, Uchimoto K, Mitsushima D, Takase K, Morita S, Goto T, Andoh T, Kamiya Y: *Neuroscience* Vol. 237, 151–60, May 2013.  
doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.062